

DER EINFLUSS DYSPROTEINÄMISCHER SEREN
AUF DIE OSMOTISCHE UND MECHANISCHE RESISTENZ
SOWIE SPONTANHÄMOLYSE
NORMALER BLUTSPENDERERYTHROZYTEN

Friederike Kirchhoff

1966

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ

Direktor: Professor Dr. R. Duesberg

DER EINFLUSS DYSPROTEINÄMISCHER SEREN
AUF DIE OSMOTISCHE UND MECHANISCHE RESISTENZ
SOWIE SPONTANHÄMOLYSE
NORMALER BLUTSPENDERERYTHROZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von
Friederike Kirchhoff
aus Hermeskeil

Mainz 1966



Dekan: Professor Dr. E. Diethelm

Referent: P. D. Dr. F. Gramlich

Korreferent: Professor Dr. R. Duesberg

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	5
II.	MATERIAL	7
	1) Testerythrozyten	7
	2) Serum	7
	3) Glasmaterial	9
III.	METHODIK	9
	1) Präparation der Testerythrozyten	9
	2) Vorbereitung der untersuchten Seren	10
	3) Ansatz der Blutproben	10
	4) Mechanische Resistenz	10
	5) Osmotische Resistenz	11
	6) Spontanhämolyse	12
IV.	STATISTISCHE METHODIK	12
	1) Häufigkeitsverteilung	12
	2) Statistische Tests	12
	a) Bartlett-Test	13
	b) Transformation	15
	c) Varianzanalyse	15
	d) Duncan-Test	17

V.	ERGEBNIS	19
1)	Auswertung der Vorversuche	19
a)	Unabhängigkeit von Testerythrozyten	19
b)	Mechanische Resistenz	19
c)	Osmotische Resistenz	19
d)	Spontanhämolysse	
2)	Weitere Beobachtungen	31
a)	Vergleich der Patientengruppen nach Diagnosen	31
b)	Seren mit Bilirubinvermehrung	31
c)	Seren mit Rest-N-Erhöhung	32
VI.	DISKUSSION	36
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	40
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	41

I. EINLEITUNG

Als gemeinsames Merkmal weisen hämolytische Anämien die Verkürzung der Erythrozyten-Überlebenszeit auf. 15) Die Ursachen bei den hereditären hämolytischen Anämien beruhen unter anderem auf pathologisch veränderten Erythrozytenformen, denen häufig Stoffwechselstörungen zugrunde liegen. Bei den erworbenen hämolytischen Anämien lassen sich in einem Teil der Fälle Iso- oder Autoantikörper nachweisen, die als Ursache für die vorzeitige Zellzerstörung angesehen werden. Bei dem weitaus größeren Teil, insbesondere den symptomatischen erworbenen hämolytischen Formen, wie sie etwa im Gefolge der verschiedenen Grundkrankheiten entstehen können, lassen sich derartige Antikörper nicht nachweisen. So kann man bei Infektionen, Tumorerkrankungen 10) 11) 13) 23), Leberzirrhosen 9) 13), Erkrankungen rheumatischer Genese 25) und bei primären oder sekundären Hyperplasien des retikuloendothelialen Systems 11) 13) 14) klinisch und experimentell mit Chrom⁵¹ markierten Erythrozyten nicht selten eine gesteigerte Hämolyse der roten Blutkörperchen feststellen. 19) Diese führt nur dann zur Anämie, wenn sie quantitativ die Blutersatzmöglichkeit des Knochenmarks überschreitet. In den häufigsten Fällen bleibt die Anämie klinisch latent.

Die Ursache dieser Hämolyse ist bislang weitgehend ungeklärt. Die klinische Beobachtung lehrt lediglich, daß sich gerade bei den oben erwähnten Krankheitsbildern neben der Anämie mit auffälliger Regelmäßigkeit einerseits verschieden starke Dysproteinämien nachweisen lassen und zum anderen fast immer eine Aktivierung des reticulohistiocyteren Zellbestandes des Organismus zu beobachten ist. Bei der Dysproteinämie handelt es sich um extreme Vermehrung in den alpha- und gamma-Globulinfraktionen. 3) 26) In dem Zusammentreffen einer solchen Dysproteinämie und Anämie kann ein Ansatzpunkt für die Suche nach den auslösenden, die Hämolyse beschleunigenden Faktoren gesehen werden.

Nur wenige Arbeiten haben sich bis heute mit der Wechselwirkung von Erythrozyten und Plasmaproteinen befaßt. So ist bekannt, daß die Senkungsgeschwindigkeit, die Wärmehämolyse und die Wärmefragmentation der roten Blutkörperchen vom Serumeiweißmilieu beeinflusst werden. 8) 12)

Hennemann weist in diesem Zusammenhang daraufhin, daß die Beladung der Erythrozyten mit Protein, besonders mit gamma-Globulinen, eine Formveränderung der roten Blutzellen bewirkt. Aus dieser Beobachtung leitet er ab, daß die Erythrozyten in vivo durch ein individuelles Eiweißspektrum spezifisch geprägt werden. Auch von ihm wurde bereits die Frage gestellt, ob Erythrozyten aus dysproteinämischem Milieu eine veränderte Autohämolyse im Vergleich zu roten Blutkörperchen aus normalem Serumeiweißmilieu aufweisen. Zwar fanden sich in seinen experimentellen Untersuchungen einige Blutansätze, die eine geringe Erhöhung der Autohämolyse zeigten, eine signifikante Steigerung der Spontanhämolyse ließ sich aber nicht feststellen. 8)

Hennemann arbeitete in seiner Versuchsanordnung im autologen System. Damit bieten diese Versuche keine Differenzierungsmöglichkeiten zwischen korpuskulären und humoralen Faktoren in ihrer Wirkung auf die Hämolyse. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit das homologe System bevorzugt; d. h. Testerythrozyten von gesunden Blutspendern wurden mit dysproteinämischen Seren inkubiert und die Spontanhämolyse sowie die osmotische und mechanische Fragilität der Erythrozyten beobachtet. Der korpuskuläre Faktor, mit dem bei Krankheitszuständen mit hochgradigen Dysproteinämien zu rechnen ist, wird bei dieser Versuchsanordnung ausgeschaltet. 18) 19) Der Ansatz der Testerythrozyten mit den dysproteinämischen Seren wurde im Verhältnis 2 : 1 inkubiert. Hiermit verband sich die Absicht, die Eindickung des Blutes, wie sie natürlicherweise in den Milzsinus als Hauptorgan der Erythroklasie vollzogen wird, nachzuahmen.

II. MATERIAL

1) TESTERYTHROZYTEN

Die Testerythrozyten wurden aus den üblichen Blutkonserven gewonnen. Das Blut wurde unmittelbar nach der Entnahme vom Spender verwendet.

2) SERUM

Insgesamt 20 Blutproben von gesunden und kranken Spendern wurden zu Versuchen verwendet. Im Hauptversuch wurden die Blutproben von 67 Patienten und das Vergleichsblut mit normalen Elektrophoresewerten von 35 gesunden Studenten untersucht. Bei allen Versuchspersonen wurde zunächst die Blutgruppe bestimmt und danach unter sterilen Bedingungen 20-25 ml Venenblut mit einer innenpolierten V2A-Stahlflügelkanüle in ein handwarmes Zentrifugenröhrchen laufen gelassen.

Die Patienten waren nach ihren Elektrophoresebefunden und nach bestimmten Diagnosen ausgewählt worden. Sie wiesen alle eine Dysproteinämie auf, und zwar 41 Patienten eine alpha-1- und alpha-2-Globulinvermehrung von mehr als 20 rel. % und 26 von ihnen eine gamma-Globulinvermehrung von wenigstens 30 rel. %. Nach den Diagnosen konnten 6 Gruppen unterschieden werden, die in Tabelle 1 aufgeführt sind (s. Seite 8).

TABELLE 1

Einteilung der Diagnosen in 6 Gruppen

1. Tumoren	14 Carcinome
2. Rheumatische Krankheiten	7 Rheumatische Erkrankungen 1 Colitis ulcerosa
3. Infekte	4 Pneumonien 3 Cholecystitiden 1 Pleuritis exsudativa 1 Tbc Epididymitis
4. Nierenerkrankungen	4 Nephritiden 4 Nephrotische Syndrome 1 Nephrosklerose 3 Urämien (Cystenniere) (Steinschrumpfniere) (Prim. Schrumpfniere)
5. Lebererkrankungen	6 Lebercirrhosen 2 Chronische Hepatitiden
6. Blut- und Retikuloendothelial- erkrankungen	4 Lymphogranulomatosen 3 Hämolytische Anämien (erworben durch inkomplette Wärme- Antikörper) (Zwei Sphärozytosen) 2 Lymphosarkome 2 Chronische Myel. Leukämien 1 Myelosklerose 1 M. Waldenström 1 Aplast. Anämie 1 Retothelsarkom 1 Lymphadenose

3) GLASMATERIAL:

Um hämolytische Einflüsse durch Verunreinigung von Netzmitteln 17), Bakterien oder Viren zu vermeiden, wurde größter Wert auf die Sauberkeit des Glasmaterials gelegt. Zunächst wurden Reagenzgläser und Erlenmeyerkolben gut mit Wasser gespült und anschließend 15-20 Minuten lang in ein Chromschwefelsäurebad gestellt. Danach wurde mit reichlich Wasser die Säure abgewaschen und mit aqua destilata nachgespült. Ungefähr 2 Stunden lang wurden dann sämtliche Glasgegenstände bei 150°C im Brutschrank sterilisiert.

III. METHODIK

1) PRÄPARATION DER TESTERYTHROZYTEN:

Sofort nach Entnahme des Blutes von den gesunden Spendern wurde die frische Konserve vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt, um die Blutzellen sofort vom Überstand trennen zu können. Daher wurden diese Röhrchen 5 Minuten bei 2 500 U/min zentrifugiert. Das überstehende Serum, die Blutsätze und Leukozytenschicht wurden scharf abgesaugt. Die Erythrozyten wurden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung etwa im Verhältnis 1 : 6 aufgeschwemmt, vorsichtig mit einem Plümber durchgemischt und wiederum 5 Minuten bei 2 500 U/min zentrifugiert. Die übersiehende Waschflüssigkeit wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. In dieser Weise wurden die roten Blutkörperchen dreimal gewaschen und am Schluß der Überstand scharf abpipettiert, so daß man ein gleichmäßig konzentriertes Erythrozyten-Sediment ohne Serumeiweißreste erhielt.

2) VORBEREITUNG DER UNTERSUCHTEN SEREN:

Das steril entnommene Nativblut aller Versuchspersonen wurde bei 4 000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert und das überstehende Serum mit Hilfe einer Pipette abgehoben. Anschließend wurde das gewonnene Serum bei 56 °C 30 Minuten lang in einem Wasserbad inaktiviert, um die Komplement-Wirkung auszuschalten. 4)

3) ANSATZ DER BLUTPROBEN:

Die gewaschenen Testerythrozyten und das inaktivierte Serum wurden im Verhältnis 2 : 1 in sterile Reagenzgläser pipettiert und bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Unter diesen Versuchsbedingungen liefen zunächst die folgenden Vorversuche: Von 5 verschiedenen Spendern wurden Erythrozyten gewaschen und alle Versuchsproben mit dem gleichen Serum eines Spenders inkubiert, um einen Einfluß von Seiten der verschiedenen roten Blutkörperchen auf die Hämolyse zu prüfen. Mit den weiteren 15 Vorversuchen wurde die günstigste Inkubationszeit getestet. Deshalb wurde zuerst nach 1, 3, 6, 9, 12 und 20 Stunden Bebrütung der Ansatz zentrifugiert und der Hämolysegrad im überstehenden Serum bestimmt. Danach wurde in weiteren Vorversuchen nach 1, 6 und 20 Stunden Inkubation gemessen, und in den endgültigen Versuchen liefen nur noch die 1 und 20 Stunden-Ansätze als Doppelversuche. Ebenso lange wurde das restliche Serum, das als Vergleichsmeßwert diente, bebrütet. Von je einem Ansatz wurden die folgenden hämatologischen Untersuchungen durchgeführt.

4) MECHANISCHE RESISTENZ:

Die mechanische Resistenz wurde nach Schubotho bestimmt: 5) 6) 21) 22) Zunächst wurden 3 ml dieser Erythrozyten-Serum-Suspension mit einem Hämatokritwert von 66 % entnommen und in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Hinzu kamen 30 geschliffene und polierte Quarzperlen von exakt 4 mm Durchmesser. Nach 2 Stunden langer Rotation bei 40 U/min auf einem Apparat, der die Firma Rotax/Basel entwickelte, wurde der prozentuale Hämolysegrad bestimmt. Die 100fache Verdünnung (0,1 ml Blut in 9,9 ml 0,04 %

NH₃) des Vollblutes diene später für die Bestimmung der 100 % Hämolyse (E₁). 0,25 ml des Überstandes wurden mit 4,75 ml NH₃ versetzt und diese 20 fache Verdünnung des hämolysierten Serums erbrachte den Extinktionswert E₂. Der Lehrwert E₃ setzte sich ebenfalls aus einer 20 fachen Verdünnung des unvorbehandelten Serums mit NH₃ zusammen, so daß nach folgender Formel die Hämolyse prozentual zu errechnen war.

$$\text{Hämolyse \%} = \frac{E_2 - E_3}{5 E_1 - E_3} \cdot 100$$

Alle diese Verdünnungsansätze wurden in 5 ml Küvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm umgefüllt. Mit Hilfe des Photometers nach Eppendorf konnten die Hämolysegrade bei einem Filter von 546 mμ gemessen werden. Die Serumverdünnung diene als Leerwert. Der ganze Untersuchungsvorgang spielte sich bei Zimmertemperatur ab.

5) OSMOTISCHE RESISTENZ:

Die osmotische Resistenz wurde folgendermaßen bestimmt: 6)

Eine 1 %ige Salzlösung wurde mit aqua destilata so verdünnt, daß eine Reihe von 12 Röhrchen mit steigender Konzentration von 0,1 % - 0,85 % Lösung entstand. 0,05 ml der Erythrozyten-Serum-Suspension wurden in 5 ml Salzlösung in jedes dieser Reagenzgläser pipettiert, gemischt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach 5 Minuten langem Zentrifugieren bei 2500 U/min wurde der Überstand in 5 ml Glasküvetten abgegossen und bei einem Filter von 578 mμ photometriert, wobei das erste Reagenzglas mit einer Salzkonzentration von 0,85 % als Leerwert diene und das 12. Röhrchen mit 0,1 % NaCl die 100 % Hämolyse angab.

6) SPONTANHÄMOLYSE:

Der restliche Ansatz wurde sofort nach diesen beiden hämatologischen Untersuchungen bei 2 500 U/min zentrifugiert und der Überstand bei 546 m μ in Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von ebenfalls 10 mm photometrisch bestimmt. Als Leerwert hier das inkubierte Serum.

IV. STATISTISCHE METHODIK

1) HÄUFIGKEITSVERTEILUNG: 16)

Um einen Überblick über alle gemessenen Werte geben zu können, wurde eine Häufigkeitsverteilung graphisch dargestellt; d.h. auf der Abszisse wurden die gemessenen Werte, eingeteilt in Gruppen, angegeben und auf der Ordinate die Häufigkeit, mit welcher die einzelnen Werte sich in den Gruppen verteilen.

Da die Häufigkeitsverteilung keine sicheren Aussagen über echte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen machen konnte, wurden verschiedene statistische Tests angewendet.

2) STATISTISCHE TESTS:

Für jeden Versuch innerhalb der Gruppen wurde das Blut verschiedener Personen verwendet. Die Einzelwerte in den Gruppen waren also voneinander unabhängig, und deshalb wurde mit der einfachen Varianzanalyse das Versuchsergebnis ausgewertet. Um dieses statistische Verfahren anwenden zu können, durften die Varianzen innerhalb der einzelnen Meßwerte einer Gruppe keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Dieses mußte erst durch den Bartlett-Test bestimmt werden.

a) Bartlett-Test: 16)

Der Bartlett-Test prüft also, ob die Voraussetzung der Gleichzeit der Varianzen erfüllt ist oder nicht nach folgender Formel:

$$\chi^2 = f \cdot \ln s^2 - \sum_{i=1}^l f_i \cdot \ln s_i^2$$

l = Anzahl der Gruppen (Spalten)

f = Summe der Freiheitsgrade aller Gruppen

s^2 = mittlere Varianz

f_i = Freiheitsgrad in der i -ten Gruppe

s_i^2 = Varianz innerhalb der i -ten Gruppe

Die Verwendung von dekadischen Logarithmen ist vorteilhaft. Der so errechnete Endwert wird mit dem Umrechnungsfaktor 2,3026 wieder multipliziert, um aus den natürlichen Logarithmen die dekadischen zu erhalten. Dieser Wert wird beurteilt nach der χ^2 -Verteilung mit $(l - 1)$ Freiheitsgraden.

FIGUR 1

THEMA: 1^h - Wert

Osmotische Resistenz

bei 0,5 % NaCl

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum \frac{1}{n_i} \cdot x_{ij}^2$ Gruppensumme ² : k_j SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	4499,103	40	112,477575
2	2205,320	23	95,883478
3	2210,020	31	71,290967
$\sum SAQ_i = SAQ$		$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
8914,443		94	94,835

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,7745
$\chi^2 = 2,3026 \cdot a$	1,7834
$\chi^2 = i - 1$	2

b) Transformation

Bei der Spontanhämolyse nach 20 Stunden Inkubation mußte mit den logarithmierten Extinktionswerten gerechnet werden, damit nach der χ^2 -Verteilung die Gleichheit der Varianzen erfüllt war.

c) Varianzanalyse: 20)

Mit Hilfe der Varianzanalyse wird ein Vergleich zwischen den Gruppenmittelwerten ermöglicht und zwar wird geprüft, ob die Abweichung der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittel größer ist als die Abweichung der Einzelwerte vom Gruppenmittel. Anders formuliert zerlegt die Varianzanalyse die Gesamtquadratsumme (s_{xx}^2) der Abweichungen aller Einzelwerte (x_{ij}) vom Gesamtmittel ($\bar{x}$) in Teilsummen, die wiederum addiert die Gesamtsumme ausmachen, weil praktisch nur der Faktor $\bar{x}_j$ zuerst abgezogen und dann wieder addiert wird. Nach folgender Berechnung erhält man die Formel der Summe der Abweichungsquadrate innerhalb und zwischen den Gruppen (SAQ):

$$s_{xx}^2 = \sum_{ij} ((x_{ij} - \bar{x}_j) + (\bar{x}_j - \bar{x}))^2$$

$$s_{xx}^2 = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + \sum_{ij} (\bar{x}_j - \bar{x})^2 + 2 \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j) \cdot (\bar{x}_j - \bar{x})$$

Der 3. Summand fällt weg.

$$s_{xx}^2 = \sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 + \sum_{ij} (\bar{x}_j - \bar{x})^2$$

$$\sum_{ij} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2 = \text{SAQ innerhalb der Gruppen}$$

$$\sum_{ij} (\bar{x}_j - \bar{x})^2 = \text{SAQ zwischen den Gruppen}$$

Diese Summenabweichungsquadrate (SAQ) werden jeweils durch die Freiheitsgrade $(1-1)$ zwischen den Gruppen und $(n-1)$ innerhalb der Gruppen dividiert, um die mittleren Abweichungsquadrate $MAQ_{ij(a)}$ und $MAQ_{j(b)}$ zu erhalten. Der Quotient dieser beiden Werte ergibt den F-Wert ($F = MAQ_a / MAQ_b$), der beurteilt wird nach der F-Verteilung (P). Zahlenbeispiel: An Hand eines Zahlenbeispiels soll die Varianzanalyse erklärt werden. Bei der osmotischen Resistenzbestimmung mit 0,5 % NaCl-Lösung nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde beträgt die Gesamtquadratsumme der Abweichungen aller Einzelwerte vom Gesamtmittel 10 218,82. Die beiden Teilsummen SAQ innerhalb und SAQ zwischen den Spalten betragen in diesem Beispiel 8 914,45 und 1 304,37, die wiederum addiert 10 218,82 ergeben. Diese beiden Quadratsummen werden folgendermaßen errechnet:

I. Der Wert 8 914,45 setzt sich aus der Quadratsumme der Abweichungen der einzelnen Zeilen (Werten) von ihrem jeweiligen Gruppenmittel zusammen.

II. Die Quadratsumme der Abweichungen, die übrig bleibt, wenn von den Abweichungen vom Gesamtmittel die Abweichungen von den Reihenmitteln abgezogen werden, beträgt 1 304,37. In Zahlen ausgedrückt ergeben sich die Werte für das Gesamtmittel 14,83 und für die Reihenmittel der ersten Gruppe ($\alpha > 20\%$) 16,14; der zweiten Gruppe ($\alpha > 30\%$) 18,75 und der dritten Gruppe (Normalversuche) 9,62. Um die Differenzen minus 5,22 und plus 3,91 und plus 1,31 (zusammen also plus 5,22) weichen die Reihenmittel vom Gesamtmittel ab, und daher gibt die Quadratsumme den Unterschied zwischen den Spalten an.

Die beiden errechneten Teilquadratsummen ergeben addiert das Gesamtsummenabweichungsquadrat.

Die Werte sind von im ganzen 97 Einzelwerten abgeleitet. Die Zahl der Freiheitsgrade oder der unabhängigen Zahlen (denn die letzte Zahl ist abhängig, weil sie aus den anderen Werten errechnet werden kann) beträgt insgesamt $97 - 1 = 96$. Der Unterschied zwischen den Spalten (Gruppen) beruht auf dem Vergleich zwischen drei Reihen, also gibt es zwei unabhängige Faktoren. Die Zahl der Freiheitsgrade beträgt dafür $3 - 1 = 2$. Die Quadratsumme der Abweichungen innerhalb der Reihen (von den Reihenmitteln) beruht auf den einzelnen Zeilen oder Werten der Gruppen (41; 24; 32;). Daher stehen je Gruppe $n_i - 1$ (40; 23; 31;) Freiheitsgrade, also 94 Freiheitsgrade insgesamt zur Verfügung. Nun werden die mittleren Abweichungsquadrate (MAQ) zwischen und innerhalb der Spalten durch Division der Quadratsummen durch die Freiheitsgrade errechnet. Das MAQ innerhalb der Spalten charakterisiert die mittlere Versuchsstreuung (Versuchsfehler). Bestehen zwischen den Gruppen keine Unterschiede, dann

ist zu erwarten, daß das MAQ zwischen den Spalten nicht wesentlich größer ist als das MAQ innerhalb der Spalten. Besteht aber ein echter Unterschied zwischen den Gruppen, dann muß das MAQ zwischen den Spalten wesentlich höher sein als das MAQ innerhalb der Spalten.

Die Werte der F-Verteilung für die entsprechenden Freiheitsgrade ergeben den Wert des Quotienten MAQ_{ij}/MAQ_j , der beim Vorliegen nur zufälliger Unterschiede bei der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit höchstens zu erwarten ist. Ist der errechnete F-Wert größer als der entsprechende Tabellenwert der F-Verteilung, kann mit der gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen werden, daß zwischen den Gruppen echte Unterschiede bestehen. In dem Zahlenbeispiel ist der errechnete F-Wert 6,88, der nun mit den Tabellenwerten 3,2; 5,0 und 7,8 verglichen wird. Diese drei Zahlen sind je nach ihrer Größe mit einer entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05; 0,01; und 0,001 behaftet.

d) Duncan-Test 24)

Die Varianzanalyse gibt nur an, daß Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen. Sie sagt aber nichts darüber aus, wo diese Unterschiede liegen und wie hoch sich im einzelnen die Gruppen voneinander unterscheiden.

Mit dem Duncan-Test für Stichproben mit unterschiedlichem Umfang können Gruppenunterschiede geprüft werden. Zunächst werden die Mittelwerte nach ihrer Größe geordnet und nach folgendem Ausdruck die Gruppendifferenzen geprüft:

$$s = \sqrt{\frac{1}{2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \cdot \sqrt{MAQ_R} \cdot q$$

n = Anzahl der Werte in einer Gruppe

$n_{1,2,3}$ = Anzahl der Werte der drei zu vergleichenden Gruppen, geordnet nach der Größe ihrer Mittelwerte

MAQ_R = Restvarianz

q = 3,702 und 3,858 (Irrtumswahrscheinlichkeit 0,01) abhängig von der Anzahl der Freiheitsgrade und der Reihenfolge der Mittelwerte.

Osmotische Resistenz

bei 0,5 % NaCl

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
13,0	20,0
16,9	16,7
37,4	17,6
18,0	11,3
7,8	16,2
6,9	14,2
14,4	23,0
23,3	5,5
6,5	4,5
10,9	14,3
3,8	17,9
12,3	14,0
5,6	17,2
40,3	45,4
33,3	41,3
8,6	23,0
21,5	20,3
8,3	5,2
16,0	1,7
12,0	5,3
10,7	

2. Gruppe	
α -Globulin > 30%	
11,2	31,0
12,8	39,1
32,0	20,0
16,8	
14,5	
19,8	
13,6	
3,0	
15,6	
9,6	
32,8	
14,9	
8,5	
20,5	
16,3	
25,5	
15,8	
21,2	
9,5	
7,7	
38,4	

3. Gruppe	
Normalversuche	
2,3	28,0
1,0	4,0
13,2	8,5
16,8	1,8
28,1	2,6
13,4	5,2
24,1	0,7
11,6	2,2
11,7	16,0
5,6	21,2
7,8	9,4
7,5	
7,8	
6,0	
0,8	
4,1	
1,0	
19,6	
23,0	
2,0	
1,0	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{x}$	16,14
Freiheitsgrade: f=n-1	40

24
18,75
23

32
9,62
31

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X.$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k} (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadrate $\sum x_{ij}^2 (3)$
97	1420,2	20793,48	22097,85	31012,30

VARIANZ	Summenabweichungsquadrat SAQ	Freiheitsgrade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	1304,373	(1-1) 2	652,187	6,877	$F_{0,01} = 5,0$ $F_{0,001} = 7,8$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	8914,45	(n-1) 94	94,834		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	10218,82	(n-1) 96			

Spalten j(1,1)

Zeilen i(1,k)

Sind die tatsächlichen Unterschiede oder die Differenzen der zu vergleichenden Mittelwerte größer als die nach dieser Formel errechneten Werte, so ist der Gruppenunterschied gesichert.

V. E R G E B N I S S E

1) AUSWERTUNG DER VORVERSUCHE:

a) Unabhängigkeit von Testerythrozyten:

Wie aus der Versuchsanordnung zu ersehen ist, wurde bewußt nicht im autologen System gearbeitet. Daher bestand natürlich die Möglichkeit, daß die Resultate vielleicht in Folge der verschiedenen Erythrozytenspender verfälscht wurden. Aber der Vorversuch hatte gezeigt, daß bei exakter Durchführung, wozu in erster Linie die gleichzeitige Abnahme und gleichartige Verarbeitung der Blutproben gehörte, die Erythrozyten als konstante Versuchsgrößen zu werten waren.

b) Ausschluß der Zwischenwerte:

In der zweiten Serie von Vorversuchen sollte getestet werden, in welchen Zeitabständen die inkubierten Ansätze eine sichtbare Erhöhung der Hämolyse im Überstand aufwiesen. Da in den ersten Stunden kaum Unterschiede gemessen wurden, und sogar der 1^h -Wert kaum geringer als der 6^h -Wert war, wurde nur noch der 1^h - und 20^h -Ansatz als Doppelversuche gemessen.

2) AUSWERTUNG DER HAUPTVERSUCHE:

Die Meßergebnisse der osmotischen und mechanischen Resistenz und der Spontanhämolyse wurden jeweils in drei Gruppen eingeteilt; die Werte der gesunden Vergleichspersonen wurden mit denen der Patienten mit einer alpha- und gamma-Globulinvermehrung getrennt betrachtet, und jeweils die Werte nach einer Stunde und nach 20 Stunden Inkubation miteinander verglichen.

a) Darstellung der Häufigkeitsverteilung:

Die Häufigkeitsverteilung gibt an, in welchem Meßbereich die einzelnen Werte nach den verschiedenen Inkubationszeiten liegen. Sie gibt einen Überblick darüber, ob die Werte in den einzelnen Gruppen gleich verteilt oder nach rechts oder links verschoben sind. Auf diese Weise ist sichtbar, daß alle Gruppen mit einer alpha- und gamma-Globulinvermehrung gleich verteilt sind. Die mechanische Resistenz weist in allen Gruppen nur eine Verteilung auf, während die Normalversuche der osmotischen Resistenz und der Spontanhämolyse zum Teil nach links verschoben sind, d. h. es wurden prozentual geringere Werte gemessen,

Legenden zu folgenden Figuren:

Figur 3: Mechanische Resistenz:

Die Werte nach 1- und 20ständiger Inkubation verteilen sich im Meßbereich von 5 % bis 13 % bzw. von 8 % bis 18 % Hämolyse in allen drei Gruppen gleichmäßig.

Figur 4: Osmotische Resistenz bei 0,5 % NaCl:

Die 1^h-Werte verteilen sich im Meßbereich von 0 % bis 55 % Hämolyse und die 20^h-Werte von 30 % bis 90 % Hämolyse in der zweiten und dritten Gruppe, während die Verteilung der Werte in der ersten Gruppe nach links verschoben ist und im Bereich von 0 % bis 30 % und von 25 % bis 70 % Hämolyse liegt.

Figur 5: Osmotische Resistenz, 50 % Hämolyse:
Hier sind die 1^h -Werte fast gleichmäßig verteilt und die 20^h -Werte liegen in der ersten Gruppe im Bereich von 0,45 % bis 0,53 % NaCl, während die Werte in den beiden anderen Gruppen nach rechts verschoben sind und im Bereich von 0,48 % bis 0,56 % NaCl liegen.

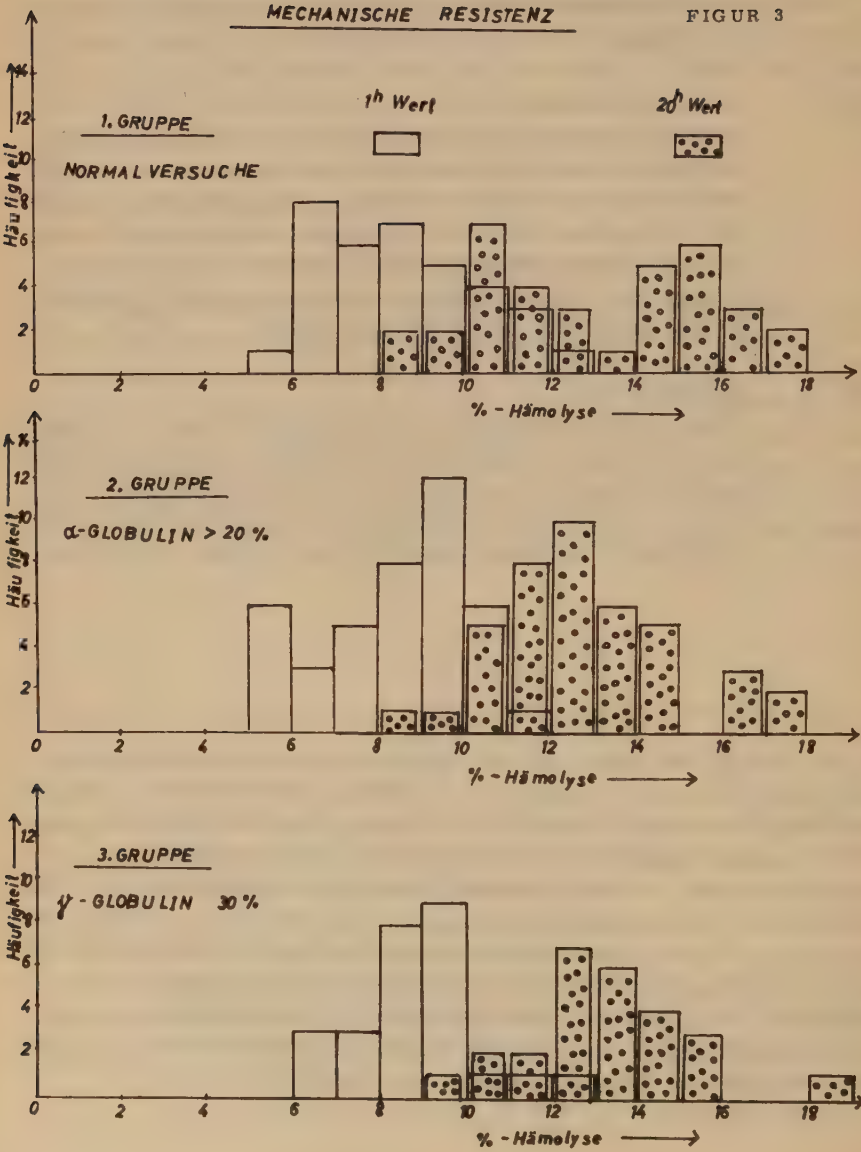
Figur 6: Osmotische Resistenz:
In dieser Darstellung werden alle gemessenen Hämolysewerte bei den verschiedenen NaCl-Konzentrationen aufgezeichnet, und die Verbindungen der einzelnen Punkte ergeben hyperbelähnliche Kurven. Zur besseren Übersicht sind nur die beiden äußersten Kurven einer jeden Gruppe eingezeichnet, innerhalb derer alle anderen Kurven liegen. Diese Darstellung zeigt deutlich eine Verschiebung der Kurven der Normalversuche nach rechts.

Figur 7: Spontanhämolyse:
Während das Maximum der Werte sich beim 1^h -Wert in der ersten Gruppe im Bereich von den Extinktionswerten 0 bis 0,05 verteilt, liegen die Werte in den beiden anderen Gruppen im Bereich von 0 bis 0,1. Die 20^h -Werte streuen etwas, so daß keine Verschiebung der Meßwerte aus dieser Darstellung herausgelesen werden kann.

b) Mechanische Resistenz:

Mit den prozentualen Hämolysewerten der mechanischen Resistenz wurde zunächst nach einer Stunde Inkubation der F-Wert bestimmt: Er beträgt $F = 0,47$. Beim Vergleich mit den Tabellen der F-Verteilung hätte der F-Wert wenigstens $P = 3,2$ betragen müssen, um mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 aussagen zu können, daß die Gruppenwerte einen Unterschied aufweisen. Ebenso beträgt der Varianzquotient für die mechanische Resistenz nach 20 Stunden Inkubation $F = 0,535$. Diese Werte sind also kleiner als 1, und damit gibt es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Diese Untersuchungen zeigen also, daß dysproteinämische Seren weder mit einer alpha-Globulin-Erhöhung über 20 % noch mit einer gamma-Globulin-Vermehrung über 30 % einen Einfluß auf die mechanische Verletzlichkeit der Erythrozyten haben.

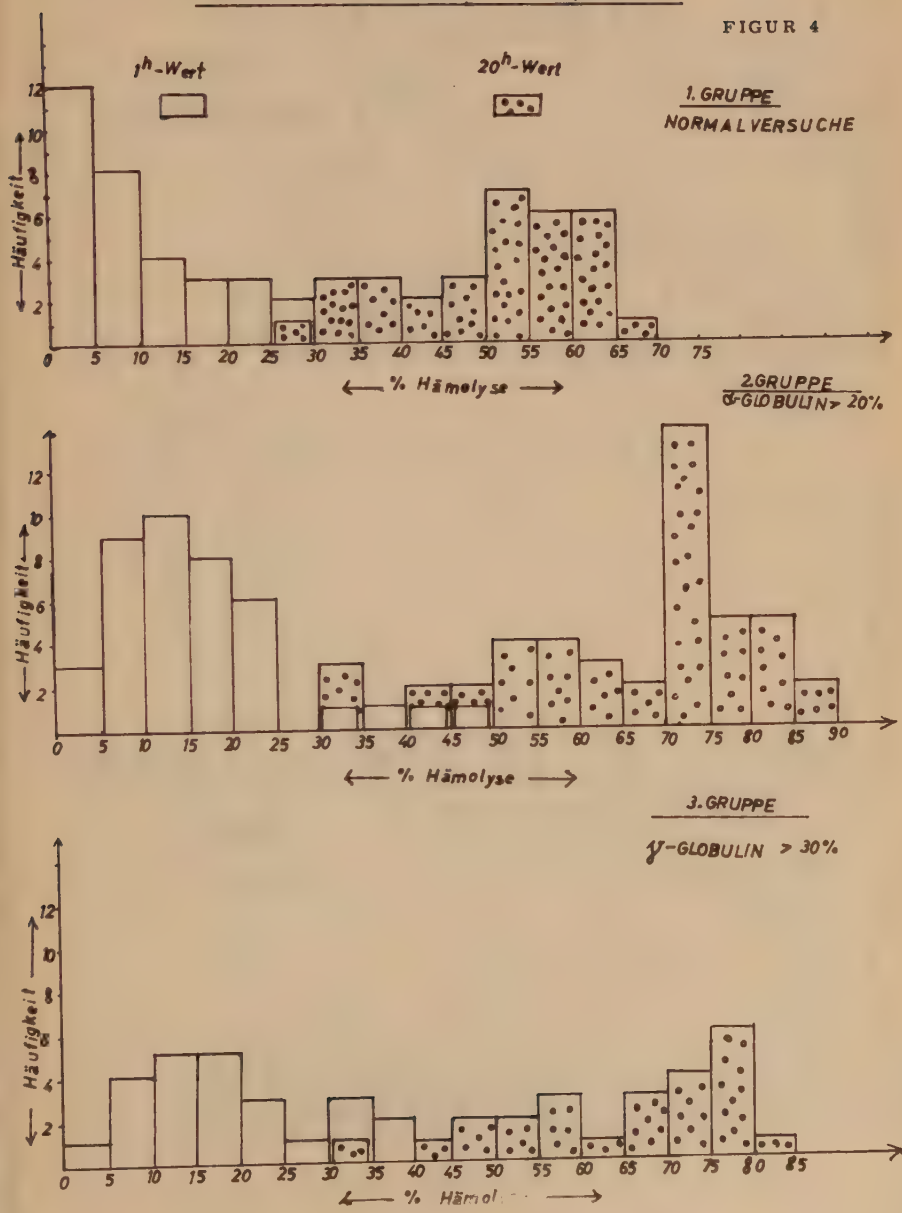
FIGUR 3:



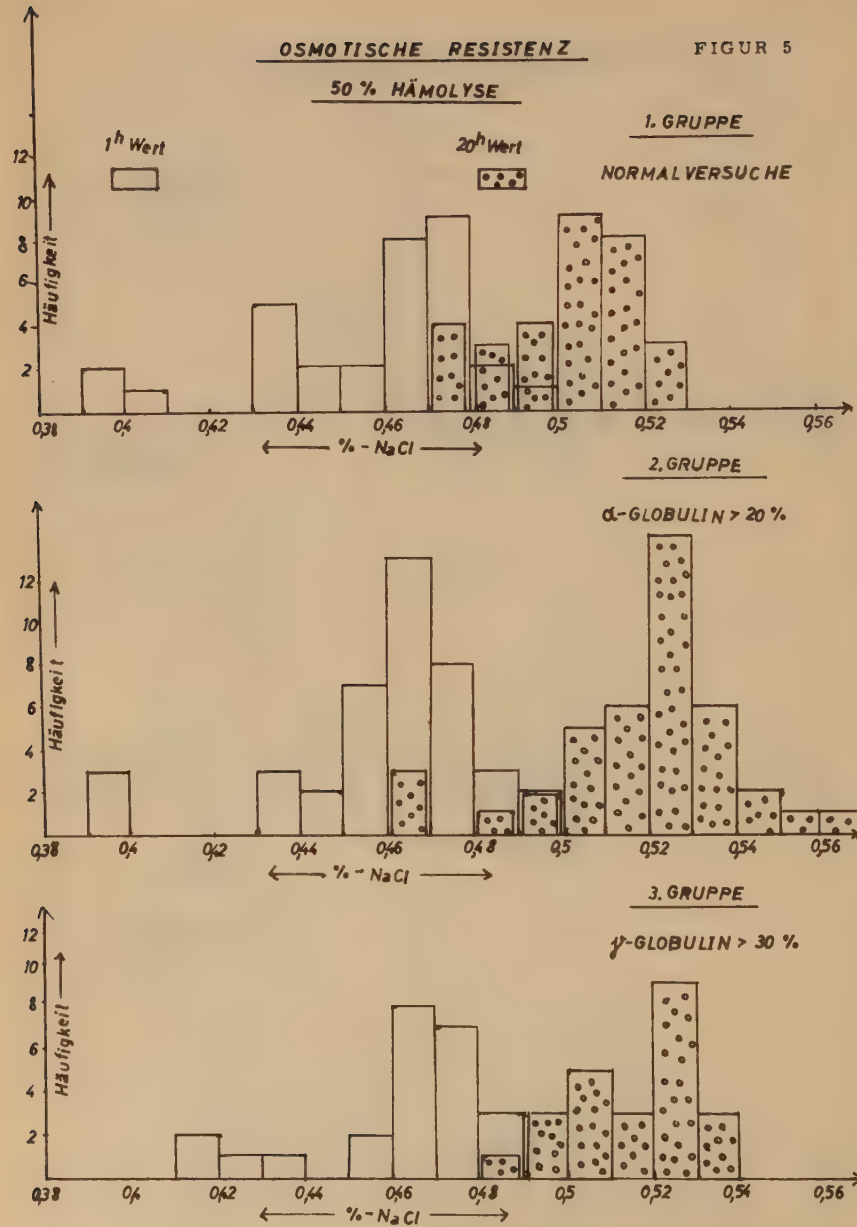
FIGUR 4:

OSMOTISCHE RESISTENZ bei 0,5% NaCl

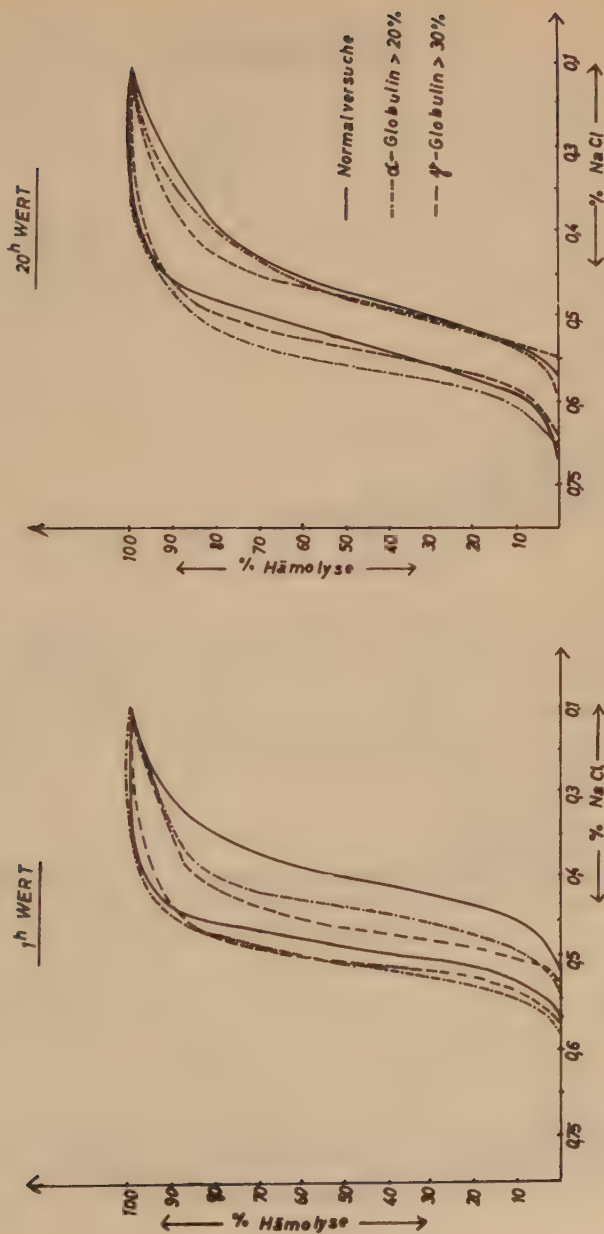
FIGUR 4



FIGUR 5:



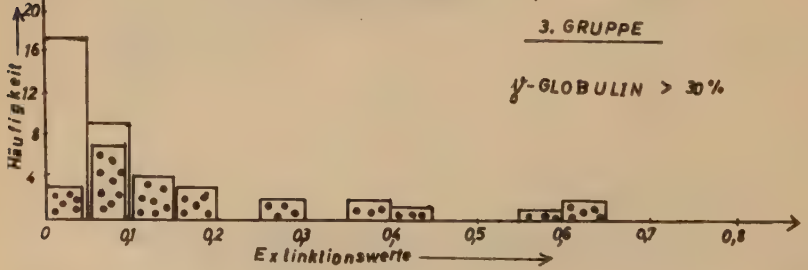
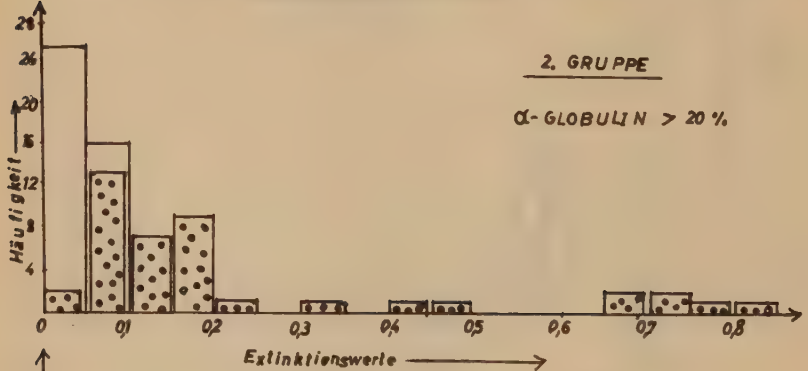
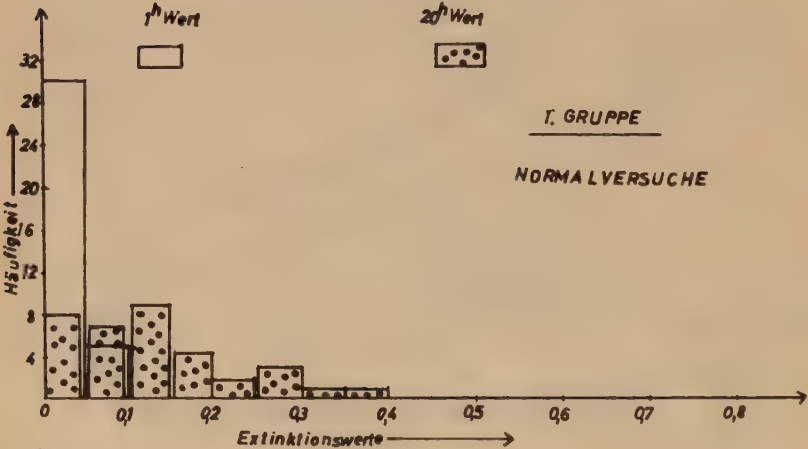
FIGUR 6
OSMOTISCHE RESISTENZ



FIGUR 7:

SPONTANHÄMOLYSE

FIGUR 7



Ergebnisse der Varianzanalyse bei der mechanischen Reistenz

Inkubationszeit	Mittelwerte %Hämolyse	Errechneter F-Wert	Tabellen- Wert	Gruppenunter- schiede
1 h	$\bar{x} = 8,42$ $\bar{x}_1 = 8,8$ $\bar{x}_2 = 8,46$ $\bar{x}_3$	0,47	$F_{0,05} = 3,2$	keine
20 h	$\bar{x} = 12,7$ $\bar{x}_1 = 13,27$ $\bar{x}_2 = 13,1$ $\bar{x}_3$	0,535	$F_{0,05} = 3,2$	keine

c) Osmotische Resistenz

Zunächst wurden die Hämolysewerte der osmotischen Resistenz bei konstanter NaCl-Konzentration von 0,5 % und schließlich die verschiedenen NaCl-Werte bei konstanter 50 % Hämolyse varianzanalytisch untersucht. Bei der ersten Untersuchung war es möglich, den geringsten Anstieg der osmotischen Fragilität zu erfassen. Die zweite Untersuchungsmethode berücksichtigte alle Hämolysewerte bei den NaCl-Konzentrationen von 0,75 % - 0,1 %.

Der F-Wert der osmotischen Resistenz bei 0,5 %iger NaCl-Lösung nach einstündiger Inkubation liegt mit 6,88 zwischen den Tabellenwerten der F-Verteilung 5,0 und 7,8. Der Unterschied wird so mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 - 0,001 gesichert. Ein statistischer Gruppenvergleich ergibt, daß die Normalversuche sich von den Versuchen mit dysproteinämischen Seren unterscheiden, und zwar sind die Hämolysewerte der Normalreihe geringer. Die prozentualen Hämolysewerte der Patientengruppe mit einer alpha-Globulinerhöhung entsprechen auch hier den Werten mit einer gamma-Globulinvermehrung. Mit $F = 14,7$ erreicht die osmotische Resistenz bei 0,5 % NaCl nach 20 Stunden Inkubation einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der Normal- und Patientenversuche. Ein Vergleich der beiden Patientengruppen miteinander bringt das Ergebnis, daß die Hämolysewerte in gleicher Weise erhöht sind.

TABELLE 3:

Ergebnisse der Varianzanalyse bei der osmotischen Resistenz mit 0,5 %iger NaCl-Lösung.

Inkubationszeit	Mittelwerte $\bar{x}$	Errechneter F-Wert	Tabellenwert	Gruppenunterschiede
1 h	$\bar{x} = 16,14$ $\bar{x}_1 = 18,75$ $\bar{x}_2 = 9,62$ $\bar{x}_3$	6,88	$F_{0,01} = 5,0$ $F_{0,001} = 7,8$	gesichert (Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,01$)
20 h	$\bar{x} = 66,09$ $\bar{x}_1 = 64,33$ $\bar{x}_2 = 50,3$ $\bar{x}_3$	14,7	$F_{0,001} = 7,8$	signifikant

TABELLE 4:

Ergebnisse des Duncan-Tests (Gruppenvergleich der osmotischen Resistenzwerte bei 0,5 % NaCl)

Gruppe	$\bar{x}$	n	tatsächl. Unterschied zwischen $\bar{x}$	$\sqrt{\frac{1}{2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \cdot \sqrt{MAQ_R} \cdot q$
1 h				
1	18,75	24	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ 2,61	6,55
2	16,14	41	$\bar{x}_1 - \bar{x}_3$ 9,13	7,24
3	9,62	32	$\bar{x}_2 - \bar{x}_3$ 6,52	6,25
20 h				
1	66,09	41	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ 1,76	8,76
2	64,33	24	$\bar{x}_1 - \bar{x}_3$ 16,79	8,36
3	50,3	32	$\bar{x}_2 - \bar{x}_3$ 14,03	9,63

$\bar{x}_{1,2,3}$ = Mittelwerte der drei zu vergleichenden Gruppen in % Hämolyse

n = Anzahl der Werte in einer Gruppe

Die 50 % Hämolyse der osmotischen Resistenzbestimmung zeigt nach einer Stunde noch keinen Unterschied zwischen den Werten, denn der Varianzquotient $F = 0,471$ liegt unter eins. Erst nach 20 Stunden Inkubation gibt es einen signifikanten Unterschied mit $F = 8,96$. Ein statistischer Gruppenvergleich zeigt, daß die osmotische Fragilität der Erythrozyten innerhalb der beiden Patientengruppen gleich ist, aber im Verhältnis zu den Normalwerten signifikant angestiegen ist. Also läßt sich hiermit nachweisen, daß die osmotische Resistenz der Erythrozyten unter dem Einfluß dysproteinämischer Seren sowohl mit einer alpha- als auch einer gamma-Globulinvermehrung nach 20 Stunden Inkubation herabgesetzt ist.

TABELLE 5:

Ergebnisse der Varianzanalyse der osmotischen Resistenz (50 % Hämolyse)

Inkubationszeit	Mittelwerte ‰-NaCl	Errechneter F-Wert	Tabellenwert	Gruppenunterschiede
1 h	$\bar{x}_1 = 0,4599$ $\bar{x}_2 = 0,4622$ $\bar{x}_3 = 0,4563$	0,471	$F_{0,05} = 3,2$	keine
20 h	$\bar{x}_1 = 0,5175$ $\bar{x}_2 = 0,5143$ $\bar{x}_3 = 0,5002$	8,97	$F_{0,001} = 7,8$	signifikant

TABELLE 6:

Ergebnisse des Duncan-Tests (Gruppenvergleich der osmotischen Resistenzwerte bei der 50 % Hämolyse)

Gruppe	$\bar{x}$ ‰NaCl	n	tatsächliche Unterschiede zwischen $\bar{x}$	$\sqrt{\frac{1}{2} \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \cdot \sqrt{MAQ_R} \cdot q$
20 h 1	0,5175	41	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$	0,0031
2	0,5143	24	$\bar{x}_1 - \bar{x}_3$	0,0172
3	0,5002	32	$\bar{x}_2 - \bar{x}_3$	0,0141
				0,01235
				0,01181
				0,01361

d) Spontanhämolysen:

Bei der Spontanhämolysen wurden zunächst die transformierten Extinktionswerte varianzanalytisch zerlegt und danach der Gruppenvergleich nach dem Duncan-Test durchgeführt. Der F-Wert nach einstündiger Inkubation beträgt $F = 6,41$. Diese Zahl liegt also zwischen den Tabellenwerten 5,0 und 7,8 und sagt aus, daß mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01 bis 0,001 ein Unterschied besteht. Der statistische Vergleich der drei Spalten untereinander bestätigt, daß die Hämolysengrade der Ansätze, die mit dysproteinämischen Seren inkubiert wurden, sich von Hämolysenwerten mit normalem Bluteiweiß unterscheiden, und zwar ist der Unterschied signifikant. Der Gruppenvergleich sagt ebenso aus, daß die Hämolysengrade der beiden Reihen mit einer alpha- und gamma-Globulinerhöhung nicht voneinander abweichen. So läßt sich nachweisen, daß die erhöhte Autohämolysen in dieser Versuchsanordnung nach einstündiger Inkubation unabhängig von einer bestimmten Dysproteinämie ist. Nach 20 Stunden Inkubation gibt es keinen echten Unterschied mehr zwischen den drei Gruppenwerten ($\bar{x}$). Der F-Wert liegt mit $F = 2,95$ gering unter der Tabellenzahl $F_{0,05} = 3,2$. In diesen Stichproben steigt also die Autohämolysen nach 20 Stunden Inkubation innerhalb der drei Versuchsreihen in gleichem Maße an und wird nicht beeinflusst vom Serum-eiweißmilieu.

TABELLE 7:

Ergebnisse der Varianzanalyse bei der Spontanhämolysen

Inkubations- zeit	Mittelwerte Extinktion	Errechneter F-Wert	Tabellen- wert	Gruppenunter- schiede
1 h	$\bar{x}_1 = 1,378$ $\bar{x}_2 = 1,296$ $\bar{x}_3 = 0,868$	6,41	$F_{0,01} = 5,0$ $F_{0,001} = 7,8$	gesichert (Irrtumswahr- scheinlichkeit 0,01 bis 0,001)
20 h	$\bar{x}_1 = 2,1768$ $\bar{x}_2 = 2,1395$ $\bar{x}_3 = 1,9661$	2,95	$F_{0,05} = 3,2$	keine

Die tatsächlich gemessenen Extinktionswerte wurden alle logarithmiert (transformiert).

TABELLE 8:

Ergebnisse des Duncan-Tests (Gruppenvergleich der transformierten Werte der Spontanhämolyse)

Gruppe	$\bar{x}$	n	tatsächlicher Unterschied zwischen $\bar{x}$	$\sqrt{\frac{1}{2} \cdot \frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}} \cdot \sqrt{MAQ_R} \cdot q$
1 ^h	1, 378	41	$\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ 0,082	0,424
	2, 296	26	$\bar{x}_1 - \bar{x}_3$ 0,510	0,407
	3, 0868	35	$\bar{x}_2 - \bar{x}_3$ 0,428	0,457

Zusätzliche Erklärung zum Duncan-Test: Sind die Differenzen zwischen den einzelnen zu vergleichenden Mittelwerten ($\bar{x}$) größer als die nach der oben angegebenen Formel errechneten Werte, so ist der Gruppenunterschied gesichert.

3) WEITERE BEOBACHTUNGEN:

a) Vergleich der Patientengruppen nach Diagnosen:

Schließlich wurde eine Varianzanalyse der Hämolysewerte der 6 Patientengruppen (nach Diagnosen eingeteilt) durchgeführt. Hierbei zeigt sich, daß sich die Hämolysegrade zwischen den verschiedenen Krankheitsgruppen nicht unterscheiden.

b) Seren mit Bilirubinvermehrung:

Weitere Nebenfunde konnten noch erhoben werden. Da es nur Einzelfälle oder kleine Gruppen waren, konnten keine statistisch verwertbaren Angaben gemacht werden. Bei Durchführung der Versuche wurden rein zufällig auch

Patientenserum verwendet, die neben einer Dysproteinämie im Blut einen Bilirubinspiegel von mehr als 4 mg% aufwiesen. Es handelte sich hier um 4 Patienten mit folgenden Krankheitsbildern: M. Hodgkin, chron. myel. Leukämie, Leberzirrhose und Gallengangscarcinom. Ein Vergleich dieser 4 Hämolysewerte mit den Normalwerten ließ auf das Ergebnis schließen, daß besonders die osmotische Resistenz der Erythrozyten bei 0,5 %iger NaCl Lösung und auch die 50 % Hämolysenach einer Stunde Inkubation im Normalbereich lag. Nach 20 Stunden Inkubation wurden sogar geringere Hämolysedegrade bei diesen 4 Patienten gemessen. Ebenso geringe Werte wies auch die Spontanhämolysenach auf. Die Werte der mechanischen Resistenz hatten eine gewisse Streuung, so daß sie sich von den anderen gemessenen Werten nicht unterschieden. Die geringere osmotische Fragilität und Spontanhämolysenach fielen auf, und es kann daher angenommen werden, daß die erhöhte osmotische Resistenz der Erythrozyten von dem Bilirubinspiegel des Blutes beeinflusst wird.

c) Seren mit Rest-N-Erhöhung:

Die Seren von 3 Patienten mit einer normalen Elektrophorese aber mit einer Rest-N-Erhöhung von 140 mg%, 229 mg% und 233 mg% wurden parallel zu den anderen Versuchen unter denselben Bedingungen mit gewaschenen Erythrozyten inkubiert. Ein Vergleich mit den Normalwerten ergab, daß die gemessenen Hämolysedegrade der mechanischen und osmotischen Resistenz und der Spontanhämolysenach den verschiedenen Inkubationszeiten den normalen Vergleichswerten entsprachen. So kann angenommen werden, daß eine Rest-N-Erhöhung im Serum die Verletzlichkeit der roten Blutkörperchen nicht unmittelbar beeinflusst.

3) WEITERE BEOBACHTUNGEN IN TABELLEN:

a) Vergleich der Patientengruppen nach Diagnosen

TABELLE 9:

Ergebnisse der Varianzanalyse

1) Mechanische Resistenz nach 1^h Inkubation

Mittelwerte % Hämolyse	Errechneter F-Wert	Tabellen- wert	Gruppenunter- schied
$\bar{x}_1 = 8,03$			
$\bar{x}_2 = 8,70$			
$\bar{x}_3 = 8,78$			
$\bar{x}_4 = 9,00$	2,03	$F_{0,05} = 2,5$	keine
$\bar{x}_5 = 7,88$			
$\bar{x}_6 = 9,50$			

2) Osmotische Resistenz bei 0,5 % NaCl nach 20^h Inkubation:

Mittelwerte % Hämolyse	Errechneter F-Wert	Tabellen- wert	Gruppenunter- schied
$\bar{x}_1 = 62,07$			
$\bar{x}_2 = 71,20$			
$\bar{x}_3 = 66,20$			
$\bar{x}_4 = 60,00$	2,31	$F_{0,05} = 2,5$	keine
$\bar{x}_5 = 55,11$			
$\bar{x}_6 = 61,70$			

b) Seren mit Bilirubinvermehrung:

TABELLE 10:

Osmotische Resistenz bei 0,5 % NaCl nach 1^h und 20^h Inkubation mit 4 Patientenseren mit einem Bilirubinspiegel von mehr als 4 mg% in % Hämolyse.

1 ^h	3,8	Mittelwert $\bar{x} = 9,2$	Mittelwert aller Normal- versuche $\bar{x} = 9,62$
	9,6		
	14,9		
	8,5		
20 ^h	19,0	Mittelwert $\bar{x} = 18,4$	Mittelwert aller Normal- versuche $\bar{x} = 50,3$
	11,3		
	16,8		
	26,5		

Die Werte der Spontanhämolyse zeigen nicht diese signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten. Die mechanische Verletzlichkeit der Erythrozyten dieser 4 Patientenseren mit Bilirubinerhöhung liegt im Normbereich.

c) Seren mit Rest-N-Erhöhung:

TABELLE 11:

Osmotische Resistenz bei 0,5 % NaCl nach 1^h und 20^h Inkubation mit 3 Patientenserum mit einer Rest-N-Erhöhung.

1 ^h	13,2 % Hämolyse	Mittelwert $\bar{x} = 9,93$	Mittelwert aller Normalversuche $\bar{x} = 9,62$
	10,9 % Hämolyse		
	5,7 % Hämolyse		
20 ^h	43,2 % Hämolyse	Mittelwert $\bar{x} = 47,13$	Mittelwert aller Normalversuche $\bar{x} = 50,3$
	35,6 % Hämolyse		
	62,6 % Hämolyse		

Die Spontanhämolyse und mechanische Resistenz der roten Blutkörperchen werden in dieser Versuchsreihe nicht beeinflusst.

VI. DISKUSSION

Überblickt man die Ergebnisse, wie sie tabellarisch zusammengefaßt auf Seite 39 dargestellt sind, dann zeigt sich, daß die Resistenz der Erythrozyten sich unter dem Einfluß von normalen und dysproteinämischen Seren zum Teil gleichartig zum Teil aber auch unterschiedlich verhält.

Die mechanische Verletzlichkeit der roten Blutkörperchen ist vom Bluteiweißmilieu offenbar unabhängig; die Normalwerte unterscheiden sich von den Dysproteinämiewerten nicht. Auffälligerweise unterliegen die einzelnen Meßwerte einer großen Streubreite. Dies könnte in der Methodik zur Bestimmung der mechanischen Resistenz begründet sein 21) 22). Allerdings ist auch zu erwähnen, daß die mechanische Vulnerabilität der Erythrozyten auch bei den serogenen hämolytischen Anämien, bei denen die Ursachen wohl bekannt sind, entweder nur gering oder gar nicht verändert ist 2). Im Gegensatz hierzu sind die Bestimmungen der Spontanhämolysen und osmotischen Resistenz offenbar weitaus empfindlicher.

Bei der Autohämolysen nach einstündiger Inkubation läßt sich ein Unterschied nachweisen, und zwar ist die Spontanhämolysen der Erythrozyten im dysproteinämischen Milieu etwas vermehrt. Nach zwanzig Stunden Inkubation kann allerdings eine signifikante Steigerung der Autohämolysen nicht mehr festgestellt werden, wenngleich einzelne Blutproben relativ hohe Lysewerte aufweisen. Diese bewegen sich aber innerhalb der auch sonst bei dieser Methode zu beobachtenden Streuung.

Eindeutige Unterschiede ergaben sich bei Prüfung der osmotischen Erythrozytenresistenz unter dem Einfluß von Normal- und Patientenseren. Bei Betrachtung der lytischen Wirkung der hypotonen Milieukonzentration von 0,5 % NaCl erwies sich die Fragilität der roten Blutkörperchen, die mit dysproteinämischen Seren inkubiert waren, sowohl nach ein- als auch nach 20-stündiger Einwirkung im Vergleich zu Normalseren signifikant erhöht. Auch die 50 %-Hämolysen wird unter dem Einfluß des pathologischen Serummilieus bei signifikant niedrigeren NaCl-Konzentrationen als unter Normalbedingungen erreicht. Dabei läßt sich zwischen den Seren mit alpha- und gamma-Globulinerhöhung kein Unterschied feststellen, so daß die Herabsetzung der osmotischen Resistenz unter dem Einfluß des Serumeiweißmilieus nicht von einer speziellen Dysproteinämie abhängig ist.

Da die korpuskulären Faktoren, die zur Hämolysen Anlaß geben können durch die Versuchsanordnung mit Fremderthrozyten von Gesunden soweit wie mög-

lich ausgeschaltet waren, bleibt zu diskutieren, ob die extreme alpha- oder gamma-Globulinerhöhung als einzige Ursache der verstärkten osmotischen Fragilität der roten Blutkörperchen anzuschuldigen ist, und über welchen Mechanismus die Dysproteinämie hämolysierend wirksam wird.

Durch das Erhitzen des Serums 30 Minuten auf 56°C wurden zwei Faktoren des cytolysierenden Komplements, und zwar die Faktoren C'_1 und C'_2 , von den vier C' -Komponenten inaktiviert. Da jede Art der Komplement-Ausschaltung die Cytolysinbildung verhindert, dürften bei gegebener Versuchsanordnung komplementabhängige Hämolyseneinflüsse tatsächlich keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse gewonnen haben. Erwähnt sei auch die immer wieder zur Erklärung der Infekt- und Tumoranämien herangezogenen aber noch weiterhin hypothetischen "Haemolysine", die in dysproteinämische Seren aus nekrotisierenden Gewebsprozessen eingeschwemmt und wirksam werden sollen. Vorderhand muß die Frage nach der Existenz und Wirkung derartiger Stoffe offen bleiben. Schließlich stellt sich die Frage, ob pathologische Verschiebungen der Proteinzusammensetzung im Plasma allein Änderungen an der Erythrozytenstruktur hervorrufen können, die in der Lage sind, die Membranstabilität entscheidend zu verändern. Die festgestellten Resultate legen zwar nicht absolut zwingend dar, daß dysproteinämische Serumeinflüsse die Erythrozytenfragilität erhöhen. Immerhin aber gewinnt diese Vorstellung bei Einordnung der gewonnenen Resultate in unser Wissen um den Plasmaproteinfilm der Erythrozyten an Wahrscheinlichkeit. Durch Anwendung radioaktiv markierter reiner Plasmaproteine war es nicht nur möglich, die Existenz eines Plasmaproteinfilms an der Erythrozytenoberfläche zu beweisen, sondern darüberhinaus auch die Zusammensetzung des Eiweißfilmes der roten Blutkörperchen in etwa abzuschätzen und die Bedingungen zu studieren, mit denen sich die Serumproteine an die Erythrozytenmembran binden. Aufgrund unterschiedlich hoher Bindungsneigung der einzelnen Plasmaproteine zur Erythrozytenoberfläche unterscheidet sich die prozentuale Zusammensetzung der Proteine im Serum grundsätzlich von der Zusammensetzung am Erythrozyten. So werden beispielsweise gamma-Globulin, Fibrinogen, alpha-Lipoprotein, alpha-2-Makroglobulin und Praealbumin auf Kosten insbesondere des Albumins auf der Erythrozytenoberfläche teils erheblich angereichert 7). Diese normale Zusammensetzung des Plasmaproteinfilmes kann unter dysproteinämischen Bedingungen sicher empfindlich gestört werden, wobei auch Auswirkungen auf die Membraneigenschaften der Erythrozyten zu erwarten sind. Daß der Plasmaproteinfilm die Membraneigenschaften der Erythrozyten mitbestimmt ist u. a. schon deshalb zu vermuten, weil die Plasmaproteine mit prinzipiell gleichen, wenn auch geringeren Kräften wie immunogene Hämagresine mit der Erythrozytenoberfläche in Kontakt treten. Im Gegensatz zu

der unbestrittenen spezifischen und in jedem Falle schädigenden Membranbeeinflussung der Hämagglutinine wirkt sich die Bindung der Plasmaproteine an der Erythrozytenoberfläche unter normalen Bedingungen stabilisierend auf die roten Blutkörperchen aus. Unter dysproteinämischen Bedingungen allerdings kann offenbar durch Änderung der normalen Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms an der Erythrozytenoberfläche eine unspezifische Störung der Membranstabilität eintreten, die der Lebenszeit der Erythrozyten ein vorzeitiges Ende setzt.

		1^h	20^h
Mechanische Resistenz	α -Glob. > 20 rel. % γ -Glob. > 30 rel. %	> 0,05 > 0,05	> 0,05 > 0,05
0,5 % NaCl Osmotische Resistenz 50 % Haemolyse	α -Glob. > 20 rel. %	< 0,01	0,001
	γ -Glob. > 30 rel. %	< 0,01	0,001
	α -Glob. > 20 rel. %	> 0,05	0,001
	γ -Glob. > 30 rel. %	> 0,05	0,001
Spontan-haemolyse	α -Glob. > 20 rel. % γ -Glob. > 30 rel. %	< 0,01 < 0,01	> 0,05 > 0,05

Ergebnis der Varianzanalyse unter Angabe der Irrtumswahrscheinlichkeit, mit der sich dysproteinämische Seren von Normalseren unterscheiden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen bei verschiedenen Krankheitsbildern mit Dysproteinämien zeigten, daß die osmotische Resistenz von normalen Blutspendererythrozyten durch die Inkubation mit den Patientenserum herabgesetzt wird. Die mechanische Resistenz und Autohämolyse nach zwanzig Stunden Inkubation unterscheidet sich von Kontrollansätzen mit Normalserum nicht. Dabei verhalten sich die Seren mit einer alpha- oder gamma-Globulinvermehrung einheitlich; die Erhöhung der osmotischen Fragilität der Erythrozyten wird also nicht von einer speziellen Konstellation der Dysproteinämie beeinflusst. Der fragilitätsfördernde Einfluß dysproteinämischer Seren wird als Störung der normalen Zusammensetzung des Plasmaproteinfilms der Erythrozytenoberfläche und der damit verbundenen Einflußänderung auf die Membraneigenschaften der roten Blutkörperchen interpretiert.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß die angewandte Methode die Möglichkeit bietet in einem relativ einfach durchführbaren Test autohämolytische Aktivitäten jeden Serums zu prüfen.

VIII. LITERATUR

1. Cavalli-Sforza, L., Grundbegriffe der Biometrie.
Gustav-Fischer Verlag (1964) S.75.
2. Dacie, J. V., The haemolytic anaemias congenital and acquired part 1
- The congenital anaemias. Part 2 - Autoimmune haemolytic anaemias.
Edit. London J & A Churchill (1960)
3. Fessel, W. J., Clinical Analysis of 142 cases with high molecular weight
serum protein.
Act. med. scand. (1962)
4. Fischer, H. und I. Haupt, Das cytolysierende Prinzip von Serumkomplement.
Zeitschrift f. Naturforschung Bd. 16 b Heft 5 (1961)
5. Fleisch, H., Der Hämoresistometer. Ein Gerät zur Bestimmung der mechanischen Resistenz der Erythrozyten. Schweiz. med. Wschr. 8, S.186
(1960)
6. Gitter, A. und L. Heilmeyer, Taschenbuch klinischer Funktionsprüfungen.
5. Aufl. Fischer Verlag (1958)
7. Gramlich F., Die Bindungsfähigkeit roter Blutkörperchen. Ein Beitrag zur
Pathogenese erworbener hämolytischer Zustände Fol. haem. N. Flge.,
9, 1, (1964)
8. Hennemann, H. H., Antikörperbeladung und Erythrozytenoberfläche.
Fol. haem. N. Flge. Bd.6 (1962) S.430
9. Hennemann, H. H., Hämolytische Syndrome bei Leberzirrhosen.
Kongreß d. europ. Ges. Haemat. Bd.5, S.341 (1955)
10. Hittmaier, A. und F. Leibetseder, Zur Häufigkeit der Carcinom-Anämien.
Proc. 7th Congr. europ. Soc. Haemat. London pp.139 (1960)
11. Hymann, G. A., A. Gellhorn und J. L. Harvey, Studies on the anaemia of
disseminated malignant neoplastic disease.
I. The hemolytic factor, Blood 9,1 (1954) pp.911
II. Studies of the life span of the erythrocytes, Blood 9, 618 (1956)
12. Köhler, K. H., Untersuchungen über die Wärmehämolyse menschlicher
Erythrozyten. Inaug.-Diss. Berlin 1957

13. Linke, A. und S. Schindera, Über die Autohämolyse invitro bei gesunden Menschen und bei inneren Erkrankungen.
7. Freiburger Symp. Springer Verlag 1961 S. 84
14. Matthias, J. Q., Red cell life and osmotic fragility in the anaemias of Hodgkin's disease and chronic lymphatic leukaemia.
Proc. 7th Congr. europ. Coc. Haemat. (London 1960 pp. 145)
15. Mohring, D., Normale und pathologische Reaktionen der Erythrozytenmembran. Blut Bd. 9 (1963) S. 481
16. Pfanzagl, I., Allgemeine Methodenlehre der Statistik I und II
Sammlung Göschen Bd. 746/747 (1964)
17. Ruhenstroht-Bauer, G., Die Biochemie der Hämolyse,
7. Freiburger Symp. (1961)
18. Schiano, S. und G. Gombos, Untersuchungen über Stoffwechselveränderungen der Erythrozyten bei Urämie, Z. Ges. exp. Med. 132 (1960) S. 496
19. Schmidt, H. A. E., W. Keiderling und W. Feisner, Die Lebenszeit Cr⁵¹ markierter Erythrozyten bei hämatologischen und infektiösen Krankheitsbildern. Fol. haemat. N. Folge Bd. 6 (1961) S. 261
20. Schmidt, W., Anlage und statistische Auswertung von Untersuchungen für Biologen, Mediziner, Psychologen und Volkswirte. Verlag M. und H. Schaper Hannover (1961) S. 114
21. Schubothe, H. und F. Po-Fun Fok, Studien über die mechanische Hämolyse Proc. 7th Congr. europ. Haemat. London (1960) pp. 1091
22. Schubothe, H. und F. Po-Fun Fok, The quantitative estimation of mechanical haemolysis for clinical application. Brit. J. Haemat. 6. pp. 350 (1960)
23. Sohier, W. D., Haemolytic anaemia, a host response to malignancy. Cancer Research 17, pp. 763 (1957)
24. Weber, Erna, Grundriß der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner.
VEB Gustav Fischer Verlag Jena (1964), S. 186
25. Wolf, F., Radiochrom in der hämatologischen Diagnostik und Forschung. Fol. haemat. N. Folge Bd. 6 (1961) S. 173
26. Wuhrmann, F. und H. H. Märki, Pathogenese und klinische Abgrenzung der Dysproteinämien und Paraproteinämien. Kongr. d. europ. Ges. f. Hämat. (1961).

FIGUR 9

THEMA: 1^h - WertMechanische ResistenzBARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum_{j=1}^k \frac{1}{n_i} \cdot x_{ij}^2$ Gruppensumme ² : k_j SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	110,8963	40	2,7724
2	54,6270	25	2,1850
3	108,0936	34	3,1792
$\sum SAQ_i = SAQ$		$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
273,6169		99	2,7638

$f \cdot \log s^2 = \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,4308
$\chi^2 = 2,3026 \cdot a$	0,9919600
$f \cdot \chi^2 = f - 1$	2

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)
 α -Globulin > 20%

7,30	9,49
9,77	10,60
9,80	8,87
8,50	5,52
8,50	5,70
8,00	9,15
9,70	9,26
9,68	6,42
9,30	5,83
8,50	10,80
5,90	10,90
8,20	8,08
7,89	9,53
9,16	6,08
10,00	7,36
10,00	8,78
10,10	5,67
5,41	9,41
7,72	9,50
6,30	11,29
7,45	

2. Gruppe
 α -Globulin > 30%

8,25	6,68
8,93	9,61
9,78	6,22
9,58	9,15
9,42	6,16
8,66	
9,00	
7,10	
9,86	
8,15	
8,57	
8,68	
8,00	
9,35	
7,68	
11,40	
9,74	
10,20	
7,40	
8,76	
12,69	

3. Gruppe
Normalversuche

9,85	6,49
8,00	6,10
9,49	7,84
9,03	6,69
11,30	5,70
11,04	12,50
10,42	7,03
7,43	8,26
9,18	7,56
7,04	9,55
8,21	10,07
10,86	6,50
6,35	10,68
8,81	11,23
6,42	
6,53	
8,58	
8,32	
8,88	
6,30	
7,69	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{X}$	8,42
Freiheitsgrade: (n-1)	40

26
8,80
25

35
8,46
34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x^2}{k} (2)$	Summe d. summierten Zeilen- quadrate $\sum x_{ij}^2 (3)$
102	870,82	7434,58	7437,179	7710,798

VARIANZ	Summenab- weichungsqua- drat SAQ	Freiheits- grade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	2,599	(1-1) 2	1,299	0,470	$F_{0,05} = 3,2$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	273,619	(n-1) 99	2,763		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	276,218	(n-1) 101			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum_{j=1}^k \frac{1}{n_i} \cdot x_{ij}^2$ Gruppensumme ² : k_j SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	183,0287	40	4,575717
2	90,2276	25	3,609104
3	243,1385	34	7,151132
$\sum SAQ_i = SAQ$		$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
516,3948		99	5,216109

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	1,6180
$\chi_0^2 = 2,3026 \cdot a$	3,7256068
$f \cdot \chi_0^2 = i - 1$	2

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
14,10	8,20
17,80	12,11
14,80	11,23
12,30	13,20
13,00	14,20
13,00	13,22
16,20	12,50
12,50	12,64
12,00	11,20
11,00	10,20
12,02	11,04
12,35	13,70
12,67	17,55
16,90	14,04
16,60	11,56
14,20	10,75
11,90	12,74
9,20	11,13
10,62	10,39
10,90	11,55
13,76	

2. Gruppe	
α -Globulin > 30%	
13,50	10,75
15,80	12,69
14,10	9,24
12,80	12,65
15,50	10,08
12,40	
12,00	
13,97	
15,80	
13,20	
14,60	
13,78	
14,30	
12,80	
12,64	
14,75	
11,50	
11,61	
13,20	
13,40	
18,10	

3. Gruppe	
Normalversuche	
10,78	14,67
14,80	8,80
14,32	12,75
14,77	15,60
15,60	10,12
16,20	11,20
15,23	11,35
16,12	10,68
14,90	11,03
9,95	17,40
10,99	12,67
15,50	12,89
10,89	11,20
10,09	17,80
8,11	
13,77	
15,27	
16,56	
15,20	
9,30	
10,76	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{x}$	12,7
Freiheitsgrade: f=n-1	40

26
13,27
25

35
13,1
34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n \quad (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k} \quad (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadraten $\sum x_{ij}^2 \quad (3)$
102	1323,40	17170,47	17176,047	17692,443

VARIANZ	Summenabweichungsquadrat SAQ	Freiheitsgrade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	5,581	(1-1) 2	2,791	0,535	$F_{0,05} = 3,2$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	516,396	(n-1) 99	5,216		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	521,977	(n-1) 101			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

Osmotische Resistenz

bei 0,5 % NaCl

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum x_i^2 - \frac{1}{n_i} \cdot x_i^2$ Gruppensumme ² : k_i SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	7936,188	40	198,4047
2	4204,325	23	182,7967
3	3720,53	31	120,0171
	$\sum SAQ_i = SAQ$	$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
	15861,043	94	168,735

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,9569
$\chi_0^2 = 2,3026 \cdot a$	2,2034
$f \chi_0^2 = i - 1$	2

Osmotische Resistenz

bei 0,5 % NaCl

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)

 α -Globulin > 20%

75,6	80,0
76,8	72,4
74,5	71,0
58,0	72,2
48,4	73,9
68,3	74,3
68,0	82,6
72,0	34,7
70,4	34,0
58,3	74,8
34,2	62,6
70,3	70,5
50,2	54,6
87,2	85,6
49,5	80,6
59,0	81,1
74,6	83,3
56,4	72,9
72,5	40,9
54,0	65,0
64,6	

2. Gruppe

 α -Globulin > 20%

76,5	67,5
57,2	78,6
65,7	72,4
50,0	
66,3	
45,5	
62,5	
33,7	
72,0	
42,3	
54,3	
56,8	
46,5	
77,5	
73,6	
78,0	
70,5	
77,3	
75,3	
59,4	
84,4	

3. Gruppe

Normalversuche

45,9	54,8
68,0	59,4
53,8	61,8
57,8	35,6
57,6	52,7
63,8	62,7
31,0	48,7
50,4	29,0
41,4	60,0
61,0	55,8
64,0	55,9
50,7	
50,0	
32,4	
41,0	
47,3	
53,5	
56,0	
38,5	
32,3	
36,7	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{x}$	66,09
Freiheitsgrade: f(n-1)	40

24
64,33
23

32
50,3
31

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n \quad (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k} \quad (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadraten $\sum x_i^2 \quad (3)$
97	5863,1	354391,150	359355,707	375216,750

VARIANZ	Summenabweichungsquadrat SAQ	Freiheitsgrade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	p
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	4964,557	(1-1) 2	2482,278	14,711	$F_{0,001} = 7,8$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	15861,043	(n-1) 94	168,734		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	20825,6	(n-1) 96			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

Osmotische Resistenz

50 % Hämolyse

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum \frac{1}{n_i} \cdot x_i^2$ Gruppensumme k_i SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	0,020941	40	0,000523
2	0,009359	23	0,000406
3	0,020565	31	0,000663
$\sum SAQ_i = SAQ$		$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
0,050865		94	0,000541

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,7188
$\chi_0^2 = 2,3026 \cdot a$	1,655109
$f \chi_0^2 = i - 1$	2

Osmotische Resistenz

50 % Hämolyse

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)		%NaCl	2. Gruppe		3. Gruppe	
α -Globulin > 20%			γ -Globulin > 30%		Normalversuche	
0,4615	0,4718		0,4646	0,4782	0,4412	0,4792
0,4704	0,4669		0,4119	0,4886	0,4345	0,4335
0,4846	0,4637		0,4302	0,4743	0,4760	0,4605
0,4600	0,4510		0,4590		0,4773	0,4831
0,4677	0,4642		0,4700		0,4807	0,4327
0,4663	0,4688		0,4639		0,4735	0,4658
0,4718	0,4717		0,4717		0,4548	0,4453
0,4768	0,3968		0,4564		0,4300	0,3914
0,4675	0,3954		0,4188		0,4730	0,4708
0,4692	0,4666		0,4626		0,4328	0,4753
0,3952	0,4570		0,4819		0,4662	0,4662
0,4583	0,4670		0,4683		0,4690	
0,4357	0,4545		0,4286		0,4609	
0,4892	0,4946		0,4718		0,4619	
0,4821	0,4900		0,4662		0,4038	
0,4554	0,4773		0,4731		0,4624	
0,4744	0,4734		0,4663		0,4947	
0,4453	0,4575		0,4736		0,4758	
0,4683	0,4340		0,4653		0,4768	
0,4354	0,4553		0,4602		0,4550	
0,4452			0,4882		0,3930	

Anzahl d. Werte : k	41	24	32
Mittelwerte : $\bar{X}$	0,4599	0,4622	0,4563
Freiheitsgrade: f=n-1	40	23	31

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X.$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zeilen (n) $x^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{H_j^2}{k_j} (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadrate $\sum x_{ij}^2 (3)$
97	44,5536	20,464157	20,464666	20,515531

VARIANZ	Summenabweichungsquadrat SAQ	Freiheitsgrade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	0,000509	(1-1) 2	0,000255	0,471349	$F_{0,05} = 3,2$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	0,050865	(n-1) 94	0,000541		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	0,051374	(n-1) 96			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,1)

Spalten j(1,1)

Zeilen i(1,k)

Osmotische Resistenz50 % HämolyseBARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum \frac{1}{x_i} \cdot x_i^2$ Gruppensumme ² : k_i SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	0,016532	40	0,000413
2	0,004715	23	0,000205
3	0,008675	31	0,000279
	$\sum SAQ_i = SAQ$	$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
	0,029922	94	0,000318

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	1,6006
$\chi^2 = 2,3026 \cdot a$	3,685542
$f \cdot \chi^2 = 1 - 1$	2

Osmotische Resistenz

50 % Hämolyse

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)		%NaCl	2. Gruppe		3. Gruppe	
α -Globulin > 20 %			γ -Globulin > 30 %		Normalversuche	
0,5208	0,5108		0,5204	0,5201	0,4945	0,5114
0,5218	0,5312		0,5080	0,5272	0,5269	0,5512
0,5208	0,5234		0,5132	0,5196	0,5085	0,5220
0,5077	0,5222		0,5000		0,5139	0,4818
0,4988	0,5202		0,5127		0,5136	0,5029
0,5310	0,5219		0,4925		0,5217	0,5127
0,5250	0,5202		0,5208		0,4768	0,4977
0,5375	0,5500		0,4837		0,5012	0,4585
0,5445	0,4675		0,5320		0,4847	0,5127
0,5350	0,4670		0,4910		0,5147	0,5090
0,5132	0,5149		0,5048		0,5161	0,5076
0,4680	0,5190		0,5070		0,5009	
0,5254	0,5059		0,4947		0,5000	
0,5003	0,5405		0,5330		0,4750	
0,5654	0,5310		0,5238		0,4902	
0,4993	0,5292		0,5294		0,4965	
0,5110	0,5313		0,5222		0,5051	
0,5252	0,5222		0,5218		0,5087	
0,5027	0,4894		0,5209		0,4804	
0,5234	0,5144		0,5087		0,4735	
0,5075			0,5367		0,4763	

Anzahl d. Werte: k	41	24	32
Mittelwerte: $\bar{x}$	0,51745	0,51434	0,50021
Freiheitsgrade: f = n - 1	40	23	31

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X.$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n \quad (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k} \quad (2)$	Summe d. summierten Zeilen- quadrate $\sum x_{ij}^2 \quad (3)$
97	49,5666	25,328328	25,334030	25,363952

VARIANZ	Summenab- weichungsqua- drat SAQ	Freiheits- grade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	0,005702	(1 - 1) 2	0,002851	8,965408	$F_{0,001} = 7,8$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	0,029922	(n - 1) 94	0,000318		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	0,035624	(n - 1) 96			

Spalten j (1,1)
Zeilen i (1,k)

Spontanhämolyse

Exstinktionswerte

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum_{j=1}^k x_{ij}^2$ Gruppensumme $= k_j$ SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	0,026677	40	0,000666
2	0,020983	25	0,000839
3	0,020397	34	0,000599
$\sum SAQ_i = SAQ$		$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
0,068057		99	0,000687

$f \cdot \log s^2 = \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,3865
$\chi_b^2 = 2,3026 \cdot a$	0,889955
$\chi_b^2 = i - 1$	2

Spontanhämolysse
Extinktionswerte

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
0,072	0,026
0,091	0,074
0,072	0
0,015	0,070
0,002	0,065
0	0,068
0,042	0,030
0,030	0,060
0,032	0,050
0,035	0,050
0	0,015
0,072	0,050
0,005	0,025
0,013	0,060
0,066	0,040
0,040	0,040
0,002	0,085
0	0,032
0,050	0,035
0,025	0,040
0,028	

2. Gruppe	
α -Globulin > 30%	
0,005	0
0,062	0,030
0,025	0,080
0,015	0,030
0,015	0,085
0,010	
0,014	
0,035	
0,003	
0,005	
0,014	
0,051	
0,056	
0	
0,050	
0,025	
0,070	
0,010	
0,025	
0,080	
0,090	

3. Gruppe	
Normalversuche	
0,015	0,010
0,050	0
0,095	0
0,026	0
0,025	0
0,031	0,080
0,045	0
0,017	0,050
0,010	0
0	0
0	0
0,030	0
0	0,005
0,020	0,045
0,020	0,036
0	
0	
0,035	
0,055	
0,030	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{X}$	0,039
Freiheitsgrade: f = n - 1	40

26
0,034
25

35
0,021
34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $X^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{X_j^2}{k} (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadraten $\sum x_{ij}^2 (3)$
102	3,222	0,101777	0,108335	0,176392

VARIANZ	Summenab- weichungsqua- drat SAQ	Freiheits- grade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	0,006558	(1 - 1) 2	0,003279	4,772925	$F_{0,05} = 3,2$ $F_{0,01} = 5,0$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	0,068057	(n - 1) 99	0,000687		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	0,074615	(n - 1) 101			

Spalten j (1, 1)
Zeilen i (1, k)

SpontanhämolyseExtinktionswerteBARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum f_i \cdot x_i^2$ (Gruppensumme ² : k_i) SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	2,117479	40	0,052936
2	0,855561	25	0,034222
3	0,316499	34	0,009308
	$\sum SAQ_i = SAQ$	$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
	3,289539	99	0,033227

$f \cdot \log s^2 = \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	10,3699
$\chi^2 = 2,3026 \cdot a$	23,8777
$\chi^2 = f - 1$	2

Spontanhämolysse
Exstinktionswerte

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
0,730	0,115
0,825	0,180
0,215	0,140
0,460	0,050
0,170	0,180
0,053	0,135
0,130	0,092
0,720	0,070
0,120	0,160
0,085	0,080
0,179	0,150
0,650	0,105
0,420	0,150
0,665	0,060
0,090	0,115
0,780	0,075
0,312	0,180
0,045	0,098
0,193	0,050
0,035	0,085
0,060	

2. Gruppe	
γ -Globulin > 30%	
0,365	0,070
0,368	0,125
0,188	0,150
0,610	0,090
0,435	0,050
0,615	
0,110	
0,142	
0,035	
0,010	
0,560	
0,368	
0,185	
0,052	
0,072	
0,285	
0,280	
0,060	
0,045	
0,115	
0,090	

3. Gruppe	
Normalversuche	
0,330	0,015
0,395	0,160
0,125	0,115
0,260	0,020
0,240	0,050
0,262	0,042
0,245	0,020
0,120	0,055
0,050	0,165
0,130	0,085
0,030	0,165
0,100	0,045
0,180	0,035
0,110	
0,147	
0,040	
0,060	
0,122	
0,100	
0,071	
0,053	

Anzahl d. Werte : k	41	26	35
Mittelwerte : $\bar{X}$	0,224	0,2106	0,127
Freiheitsgrade: f=n-1	40	25	34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $x^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k_j} (2)$	Summe d. sum- mierten Zeilen- quadrate $\sum x_{ij}^2 (3)$
102	19,109	3,57994	3,780392	7,069931

VARIANZ	Summenab- weichungsqua- drat SAQ	Freiheits- grade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	0,200452	(1-1) 2	0,100226	3,02	$F_{0,05} = 3,2$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	3,289539	(n-1) 99	0,033227		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	3,489991	(n-1) 101			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,1)

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

FIGUR 23

THEMA: 1^h - Wert

Spontanhämolyse

transformierte Exstinktionswerte

BARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum \frac{1}{n_i} \cdot x_i^2$ Gruppensumme $\sum k_j$ SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	14,016159	40	0,350403
2	7,805666	25	0,312226
3	19,532231	34	0,574477
	$\sum SAQ_i = SAQ$	$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
	41,354056	99	0,417717

$f \cdot \log s^2 = \sum f_i \cdot \log s_i^2 = s$	1,5123
$\chi^2 = 2,3026 \cdot s$	3,482222
$f \cdot \chi^2 = f - 1$	2

Spontanhämolysse (Log. d.
Extinktionswerte)

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
1,8573	1,9294
1,9590	1,5051
1,8573	1,5441
1,1761	1,6021
0,3010	1,4150
0	1,8692
1,6232	0
1,4771	1,8451
1,5051	1,8129
1,5441	1,8325
0	1,4771
1,8573	1,7782
0,6990	1,6990
1,1139	1,6990
1,8195	1,1761
1,6021	1,6990
0,3010	1,3979
0	1,7782
1,6990	1,6021
1,3979	1,6021
1,4472	

2. Gruppe	
α -Globulin > 30%	
0,6990	0
1,7924	1,4771
1,3979	1,9031
1,1761	1,4771
1,1761	1,9294
1,0000	
1,1461	
1,5441	
0,4771	
0,6990	
1,1461	
1,7076	
1,7482	
0	
1,6990	
1,3979	
1,8451	
1,0000	
1,3979	
1,9031	
1,9542	

3. Gruppe	
Normalversuche	
1,1761	0
1,6990	0,6990
1,9777	1,6532
1,4150	1,5563
1,3979	1,0000
1,4914	0
1,6532	0
1,2304	0
1,0000	0
0	1,9031
0	0
1,4771	1,6990
0	0
1,3010	0
1,3010	
0	
0	
1,5441	
1,7404	
1,4771	
0	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{x}$	1,378
Freiheitsgrade: f = n - 1	40

26
1,296
25

35
0,868
34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zeilen (n) $x^2 : n \quad (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{x_j^2}{k} \quad (2)$	Summe d. summierten Zeilenquadrate $\sum x_{ij}^2 \quad (3)$
102	120,5868	142,560551	147,917534	189,271590

VARIANZ	Summenabweichungsquadrat SAQ	Freiheitsgrade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	5,356983	(1 - 1) 2	2,678491	6,4122	$F_{0,01} = 5,0$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	41,354056	(n - 1) 99	0,417717		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	46,711039	(n - 1) 101			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

Spontanhämolysse

transformierte Exstink-
tionswerteBARTLETT - TEST

Gruppe (Spalte) i	Summe d. quadrierten Werte $\sum x_{ij}^2 - \frac{1}{k_i} \cdot x_i^2$ (Gruppensumme ² : k_i) SAQ_i	Freiheitsgrad der Gruppen $f_i = n_i - 1$	$s_i^2 = \frac{SAQ_i}{f_i}$
1	5,664283	40	0,141607
2	4,876572	25	0,195062
3	4,664216	34	0,137182
	$\sum SAQ_i = SAQ$	$\sum f_i = f$	$s^2 = \frac{SAQ}{f}$
	15,205071	99	0,153586

$f \cdot \log s^2 - \sum f_i \cdot \log s_i^2 = a$	0,4719
$\chi^2 = 2,3026 \cdot a$	1,0866
$\chi^2 = f - 1$	2

Spontanhämolyse (Log. d.
Exstinktionswerte)

EINFACHE VARIANZANALYSE

1. Gruppe (REIHE)	
α -Globulin > 20%	
2,8633	2,0607
2,9165	2,2553
2,3324	2,1461
2,6628	1,6990
2,2304	2,553
1,7243	2,1303
2,1139	1,9638
2,8573	1,8451
2,0792	2,2041
1,9294	1,9031
2,2529	2,1761
2,8129	2,0212
2,6232	2,1761
2,8228	1,7782
1,9542	2,0607
2,8921	1,8751
2,4942	2,2553
1,6532	1,9912
2,2856	1,6990
1,5441	1,9294
1,7782	

2. Gruppe	
γ -Globulin > 30%	
2,5623	1,8451
2,5658	2,0969
2,2742	2,1761
2,7853	1,9542
2,6385	1,6990
2,7889	
2,0414	
2,1523	
1,5441	
1,0000	
2,7482	
2,5658	
2,2672	
1,7160	
1,8573	
2,4548	
2,4472	
1,7782	
1,6532	
2,0607	
1,9542	

3. Gruppe	
Normalversuche	
2,5185	1,7243
2,5966	1,1761
2,0969	2,2041
2,4150	2,0607
2,3802	1,3010
2,4183	1,6990
2,3892	1,6232
2,4548	1,3010
2,0792	1,7404
1,6990	2,2175
2,1139	1,9294
1,4771	2,2175
2,0000	1,6532
2,2553	1,5441
2,0414	
2,1673	
1,6021	
1,7782	
2,0864	
2,0000	
1,8513	

Anzahl d. Werte: k	41
Mittelwerte: $\bar{X}$	2,1768
Freiheitsgrade: f = n - 1	40

26
2,1395
25

35
1,9661
34

Anzahl aller Werte n	Summe aller Werte $\sum x_{ij} = X$	Quadrat d. Summe dividiert durch die Zellen (n) $X^2 : n (1)$	Summe d. quadrierten Gruppensummen dividiert durch k $\sum \frac{X_k^2}{k} (2)$	Summe d. summierten Zellenquadrate $\sum x_{ij}^2 (3)$
102	213,6871	447,668399	448,575969	463,781040

VARIANZ	Summenab- weichungsqua- drat SAQ	Freiheits- grade f	$MAQ = \frac{SAQ}{f}$	$F = \frac{MAQ_a}{MAQ_b}$	P
a. Zwischen den Gruppen (2) - (1)	0,907570	(1 - 1) 2	0,453785	2,954598	$F_{0,05} = 3,2$
b. Innerhalb der Gruppen (3) - (2)	15,205071	(n - 1) 99	0,153586		
c. Gesamtvarianz (3) - (1)	16,112641	(n - 1) 101			

Spalten j(1,1)
Zeilen i(1,k)

LEBENS LAUF

Am 4.8.1940 wurde ich als viertes Kind des Forstmeisters Bernhard Kirchhoff und seiner Ehefrau Elisabeth geb. Simon in Hermeskeil geboren. Im Herbst 1946 trat ich in die Volksschule in Hermeskeil ein. Von Ostern 1950 bis 1956 besuchte ich das Neusprachliche Gymnasium in Hermeskeil und anschließend das Neusprachliche Gymnasium der Ursulinenschule in Trier, wo ich am 22.2.1960 die Reifeprüfung ablegte. Im April 1960 erhielt ich die Studierenerlaubnis für Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Im April 1961 bestand ich die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und nach dem fünften vorklinischen Semester legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab. Danach wechselte ich die Universität und immatrikulierte mich im November 1962 an der Medizinischen Fakultät der Georg August-Universität Göttingen, wo ich die beiden ersten klinischen Semester studierte. Im Oktober 1963 schrieb ich mich wieder an der Medizinischen Fakultät in Mainz ein, wo ich am 18.1.1966 vor dem ärztlichen Prüfungsausschuß in Mainz das medizinische Staatsexamen vollständig bestand. Vom 1. April 1966 bis 30. Oktober 1966 arbeitete ich als Medizinalassistentin in der Chirurgischen Abteilung des Ev. Elisabeth-Krankenhauses in Trier. Seit 1. November 1966 bin ich in der Gynäkologischen Abteilung desselben Krankenhauses tätig.

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. R. Duesberg für Überlassung des großzügig ausgestatteten Arbeitsplatzes in den Laboratorien seiner Klinik und bei Herrn P. D. Dr. F. Gramlich für die Themawahl und hilfreiche Mitarbeit bedanken.

